

Vergleichende Untersuchungen
über die Neutralrot-Reaktion nach Dubos
und Middlebrook an pathogenen und
apathogenen Mycobakterien

Julius Schöpp

Aus dem Bakteriologischen Institut Warthausen (Württ.)
Vorgelegt vom Institut für Tierhygiene der Universität München
Vorstand: Professor Dr. A. Meyn

VERGLEICHENDE UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE
NEUTRALROT-REAKTION NACH DUBOS UND MIDDLEBROOK
AN PATHOGENEN UND APATHOGENEN MYCOBAKTERIEN

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der veterinär-medizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Julius Schöpp
prakt. Tierarzt
aus Schönberg (Ndb.)



München 1959

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Professor Dr. K. Zipf

Referent: Professor Dr. A. Meyn

Tag der Promotion: 27. Februar 1959

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I. Einleitung	1
II. Der Neutralrot-Test nach Dubos und Middlebrook	2
A. Zum Reaktionsmechanismus des Neutralrot-Testes	2
B. Die Leistungsfähigkeit des Neutralrot-Testes	3
III. Eigene Untersuchungen	8
A. Material und Methode	8
B. Untersuchungsergebnisse	10
1. Vorversuch	10
2. Hauptversuche	11
a) 1. Versuchsreihe	11
b) Besprechung der Untersuchungsergebnisse	17
c) 2. Versuchsreihe	23
d) Besprechung der Ergebnisse	26
IV. Schlußzusammenfassung	28
V. Schrifttum	29
Lebenslauf	32



Digitized by the Internet Archive
in 2026

I. E I N L E I T U N G

Beim Zustandekommen einer tuberkulösen Erkrankung spielen Empfänglichkeit des Wirtes einerseits und Virulenz der Erreger andererseits die wichtigsten Rollen. Die Virulenz eines Stammes stellt dabei aber nicht eine absolute Eigenschaft des Erregers dar, die stets für jede Wirt-Erreger Beziehung von vorne herein feststeht. Von Virulenz kann vielmehr immer nur im Zusammenhang mit einem ganz bestimmten Wirtsorganismus, z.B. dem Menschen, dem Rind, dem Kaninchen oder dem Meerschweinchen gesprochen werden.

Nach Untersuchungen der letzten Jahre scheint eine an der Oberfläche von säurefesten Bakterien haftende Substanz, von R. Koch bereits als Kittsubstanz, von Dubos und Middlebrook neuerdings als "Cord-factor" bezeichnet, in entscheidendem Maße für die Virulenz der Erreger verantwortlich zu sein. Da man diese Substanz mit verschiedenen Farbstoffen, u. a. auch mit Neutralrot anfärben kann, ist es unter Umständen möglich, mit einer geeigneten Methode "in vitro" gewisse Aussagen über die Virulenz eines Mycobakterienstammes zu machen.

Herr Professor Dr. A. Meyn hat mich deshalb beauftragt, im sog. Neutralrottest nach Dubos und Middlebrook sowohl pathogene (*Mycobakt. tub. var. hominis et bovis*, *Mycobakt. avium*, *Mycobakt. paratuberculosis*) als auch apathogene Mycobakterien (*Mycobakt. phlei*, *Mycobakt. lacticola* u. a.) vergleichend zu untersuchen.

II. DER NEUTRALROT-TEST NACH DUBOS UND MIDDLEBROOK

A. Zum Reaktionsmechanismus des Neutralrot-Testes

Bei dem von Dubos und Middlebrook (8) im Jahre 1948 zum ersten Male beschriebenen Virulenztest mit Neutralrot werden Reinkulturen von säurefesten Stäbchen zweimal mit 50 %igem Methylalkohol gewaschen und nach Zentrifugieren in einer alkalischen Pufferlösung (p_H 8, 9) aufgeschwemmt. Zu der Bakteriensuspension gibt man dann einige Tropfen einer wäßrigen Lösung von Neutralrot. Die Lösung färbt sich, da sie alkalisch reagiert, sofort gelb. Nach etwa einer halben Stunde zeigen die sich in der Reagenzglas- und absetzenden virulenten Bakterien eine mehr oder weniger rote Färbung, während avirulente Bakterien gelb bleiben.

Nach Kölbel (12) gibt es hinsichtlich des Mechanismus dieser unterschiedlichen Farbstoffaufnahme zwei Erklärungen. Einmal kann die positive Neutralrot-Reaktion dadurch bedingt sein, daß zwischen virulenten und avirulenten Mycobakterien spezifische chemische Unterschiede bestehen, wie sie von Asselineau und Lederer (1) aufgezeigt worden waren. Als andere Erklärung muß die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, daß enzymatische Vorgänge an der Reaktion beteiligt sind, eine Ansicht, die von Desbordes und Fournier (7) vertreten wurde. Kölbel (12) selbst hat bei seinen Untersuchungen mit lebenden und abgetöteten Bakterien sowie Bakterienextrakten folgendes festgestellt:

Oberhalb p_H 8 stellt das Neutralrot eine ungeladene Farbbase gelber Färbung dar, welche sowohl von virulenten als auch avirulenten Bakterien auf lipoidem Wege aufgenommen werden kann. Virulente Bakterien wandeln aber dann im Gegensatz zu avirulenten diese ungeladene Farbbase in ein einfach positiv geladenes Farb-Kation (mit saurer Reaktion) um, das eine rote Färbung aufweist. Es handelt sich dabei um eine ionogene Umwandlung des Farbstoffes. Sie wird in erster Linie durch die Carboxylgruppen freier Fettsäuren, die als Mycolsäure, Tuberculostearinsäure und Phthionsäure in Mycobakterien enthalten sind, verursacht.

Bei Versuchen mit Chloroformextrakten aus *Mycobakt. lacticola*, einem säurefesten Saprophyten, zeigte sich, daß auch solche avirulenten Bakterien Substanzen enthalten, die unter geeigneten Bedingungen eine positive Neutralrot-Reaktion geben können. Kölbel nimmt an, daß unter natürlichen Verhältnissen diese Stoffe bei avirulenten Keimen entweder maskiert oder nur in sehr geringer

Menge vorliegen. Es besteht auf Grund seiner Untersuchungen aber auch die Möglichkeit des gleichzeitigen Vorhandenseins beider Faktoren.

Hinsichtlich der Beantwortung der Frage nach den Ursachen der Neutralrot-Reaktion folgert Kölbel : "Nach dem bisher Gesagten scheint es sicher, daß die Ursache der in gewissen Grenzen durch den Neutralrot-Test gegebenen Unterscheidungsmöglichkeiten zwischen virulenten und avirulenten Mycobakterien in dem Vorhandensein oder Fehlen chemisch definierbarer Substanzen zu suchen ist, und daß es für die Erklärung des Färbungsmechanismus nicht notwendig ist, Unterschiede in der Ausrüstung der Bakterien mit komplizierten Fermentsystemen heranzuziehen. Das bestätigen auch Versuche von Viallier und Tigaud, die keine signifikanten Unterschiede in der Neutralrot-Anfärbbarkeit zwischen lebenden und abgetöteten Bakterien des gleichen Stammes finden konnten. Daß die durch diesen Test nachweisbaren stofflichen Unterschiede ihrerseits durch unterschiedliche Fermentleistungen bedingt werden, wird hiervon nicht berührt".

Abschließend soll noch erwähnt werden, daß auch mit anderen Farbstoffen eine Unterscheidung virulenter und avirulenter Mycobakterien möglich ist. Desbordes und Fournier (7) haben dazu Nilblau, Bloch (3) Methylenblau, Wilson und Kalish (21) Indophenolblau verwendet.

B. Die Leistungsfähigkeit des Neutralrot-Testes

Bei der Nachprüfung des von Dubos und Middlebrook angegebenen in vitro-Verfahrens der Virulenzprüfung mit Neutralrot untersuchten Hauduroy und Posternak (11) 67 virulente und 67 avirulente Mycobakterienstämme. Sie fanden dabei die Ergebnisse der amerikanischen Forscher bestätigt, stellten aber auch klar heraus, daß bei dieser cytochemischen Reaktion Unterschiede in der Intensität der Färbungen eine gewisse Rolle spielen können. Die Autoren brachten diese Unterschiede in der folgenden Tabelle zum Ausdruck.

Von den Bazillen	Zeichen	Material
<u>angenommene Färbung</u>		
purpurrot	+++	Stamm H 37 Rv und Tuberkelbakterien aus pathologischem Material
purpurrot weniger stark	++	Stamm H 37 Rv und Tuberkelbakterien aus pathologischem Material
rosa	+	BCC-Stämme
gelb	-	Stamm H 37 Ra, Mycobact. smegmatis, Mycobact. phlei u. s. w.

Richmond und Cummings (16) beschrieben einen Fall, in dem ein aus Erde gezüchteter säurefester Mycobakterienstamm neutralrot positiv reagierte, obwohl er sich im Tierversuch als avirulent erwies.

Morse, Dail und Orlitzky (14) untersuchten insgesamt 195 Mycobakterienstämme im Neutralrot-Test. Dabei fanden sie u. a. auch 2 Stämme, die positiv reagierten, bei Meerschweinchen und Kaninchen aber keine Tuberkulose hervorriefen. Wie weitere Untersuchungen dann zeigten, handelte es sich bei diesen 2 Stämmen um Geflügeltuberkelbakterien.

Stoll (19, 20) zog den Neutralrot-Test zur Differenzierung pathogener und apathogener Mycobakterien heran. Nach der Originalvorschrift von Dubos untersuchte er insgesamt 36 humane, 44 bovine, 14 aviäre und 28 als apathogene bekannte Stämme. Alle 94 geprüften pathogenen Stämme reagierten positiv. Dabei waren frisch isolierte Stämme i. d. R. intensiver rot gefärbt als alte Sammlungsstämme. Eine besonders starke Rotfärbung trat bei den Rindertuberkelbakterien auf. Die untersuchten Geflügeltuberkelbakterienstämme färbten sich dagegen im allgemeinen nur schwach rot an. Unter den apathogenen säurefesten Saprophyten zeigte ein aus Wasser gezüchteter Stamm eine intensiv rote und ein *Lacticola*-Stamm eine schwach rote Färbung. Die übrigen 26 Stämme blieben unverändert gelb. Der Verfasser kommt auf Grund seiner Ergebnisse zu dem Urteil, daß die Neutralrot-Reaktion in der kulturellen Tuberkulosedagnostik die Möglichkeit einer frühzeitigen Orientierung über das Vorliegen pathogener oder apathogener Mycobakterien unter Umgehung des Tierversuches biete, daß man aber mitunter auch mit falschen Ergebnissen rechnen müsse.

Brodhage (5) verglich den Ausfall des Neutralrot-Testes mit der Cordbildung

auf Ölsäure-Albuminagar nach Dubos. Dabei stellte er fest, daß alle Tuberkelbakterien, die Cordbildung zeigten, in dem Test eine intensiv rote Färbung aufwiesen. Was die Frage der in vitro-Bestimmung der Virulenz anbelangt, so hält der Verfasser aber für die Routinearbeit die Beobachtung der Cordbildung für geeigneter als die cytochemische Reaktion. Der Neutralrot-Test soll besonderen Anforderungen vorbehalten bleiben.

Grassi und Cai ani (10) haben die Virulenz von 25 Tuberkelbakterienstämmen, 1 BCG-Stamm und 10 Stämmen apathogener Saprophyten in Tierversuchen und mit den cytochemischen Reaktionen nach Dubos und Middlebrook (Neutralrot), sowie Wilson und Kalish (Indophenolblau) untersucht. Beim Vergleich der biologischen und cytochemischen Methoden ergab sich, daß die "in vitro" Untersuchungen nicht immer mit den "in vivo" gewonnenen Ergebnissen übereinstimmten und letztere daher als grundlegend angesehen werden müssen. Bei den apathogenen Saprophyten sind die cytochemischen Reaktionen stets negativ ausgefallen.

Schrödter (18) untersuchte im Neutralrot-Test neben einer großen Zahl humaner Stämme auch den avirulenten humanen Standardstamm H 37 Ra und einen BCG-Stamm. Dabei färbten sich die beiden zuletzt genannten Stämme wie die virulenten humanen Tuberkelbakterien rot. Sie reagierten also eindeutig positiv, obwohl sie in Tierversuchen an Meerschweinchen keine tuberkulösen Erkrankungen hervorriefen. Auch nach verschiedenen Modifikationen der Methode (Änderung des p_H -Wertes, Ersatz des üblichen Veronalpuffers durch Luminal- bzw. reinen Natriumbarbituratpuffer, Reduzierung der zugesetzten Puffermenge) blieben die Ergebnisse mit diesen 2 Stämmen, die übrigens im flüssigen Nährmilieu "Cordbildung" zeigten, gleich. Bei den anderen Stämmen stimmten die Ergebnisse der cytochemischen und biologischen Virulenzbestimmung überein. Die Autorin beobachtete u. a. auch noch, daß durch den zweimaligen Waschprozeß mit 50 %igem Methylalkohol die Tuberkelbakterien nicht in allen Fällen abgetötet wurden. In 13 % der Fälle überlebten die Keime diese Prozedur; ein Umstand, der auf eine ungleichmäßige Suspendierung der Bakterien im Alkohol zurückgeführt wurde.

Buchanan (6) untersuchte mit dem Neutralrot-Test 121 virulente Tuberkelbakterienstämmen, 2 tuberkelbakterienähnliche avirulente Stämme, 6 farbstoffbildende Mycobakterienstämmen und je 1 Stamm von Vole- und BCG-Bakterien. Die vorher im Meerschweinchenversuch als virulent erkannten Tuberkelbakterien gaben eine positive und die 2 avirulenten und 6 chromogenen Stämme eine negative Reaktion. 64 Stämme wurden mit einer modifizierten Neutralrot-Reaktion (Weglassen des zweimaligen Waschens mit Methylalkohol) untersucht. Dabei reagierten im Gegensatz zum Standardtest 2 drei Jahre alte La-

laboratoriumsstämme negativ.

Mariotti (13) verglich an 62 aus menschlichem Untersuchungsmaterial isolierten Tuberkelbakterienstämmen den Neutralrot-Test, die Indophenolblau-Reaktion (Wilson) und die Nilblau-Reaktion (Desbordes). In 81,3 % der Fälle stimmte der Ausfall aller 3 Reaktionen überein. Diese Stämme erzeugten auch bei der Impfung an Meerschweinchen nach 40 Tagen das typische Bild einer fortschreitenden tuberkulösen Infektion. Der Verfasser ist der Ansicht, daß aus dem Verhalten der einzelnen Reaktionen (verschiedene Farbintensität) auch auf den Grad der Virulenz geschlossen werden kann.

Beeuwkes (2) verwendete Neutralrot als Zusatz zu einem Eiernährboden, um so zu einer Differenzierung von Tuberkelbakterien und apathogenen säurefesten Saprophyten zu gelangen. Auf diesem Nährboden wurden 55 Stämme apathogener Mycobakterien und 120 Tuberkelbakterienstämmen vergleichend getestet. Es zeigte sich, daß die Tuberkelbakterien (humane und bovine Stämme) die bräunliche Farbe des Nährbodens nicht veränderten, aber die Kolonien selbst eine rötliche Färbung annahmen. Im Gegensatz dazu färbten die apathogenen Saprophyten den Nährboden stets hell- bis dunkelviolett und zeigten keine Rotfärbung der Kolonien.

Einen bemerkenswerten Beitrag zur Frage der Beziehungen zwischen Virulenz und Neutralrot-Test leisteten Goldman und Goldman (9). Sie untersuchten das Verhalten der Neutralrot-Reaktion und der Cordbildung an dem avirulenten humanen Standardstamm H 37 Ra und dem von Richmond und Cummings (16) isolierten avirulenten *Mycobact. spec.* - dem sog. "radis bacillus" - unter verschiedenen Bedingungen. Es zeigte sich, daß junge Kulturen des avirulenten H 37 Ra-Stammes auf einem halbsynthetischen Nährboden zuerst neutralrotpositiv reagierten und nur bei längerer Bebrütung keine Rotfärbung mehr zeigten. Die Einsaatmenge der Bakterien wirkte sich auf den Ausfall der Reaktion in dem Sinne aus, daß bei geringem Inoculum der positive Neutralrottest eine längere Zeit - bis zu 17 Tagen - anhielt. Auf Löwenstein-Jensen-Nährböden trat der Umschlag von positiv nach negativ im allgemeinen noch später auf. Die Untersuchungen ließen somit erkennen, daß der Neutralrot-Test je nach den Bebrütungsbedingungen der Ausgangskulturen (Bebrütungsdauer, Einsaatmenge, Nährmedium) positiv oder negativ sein kann. Die Cordbildung konnte in analoger Weise beeinflusst werden.

Zu einem ganz ähnlichen Ergebnis kamen Pirotta und Pedrazzi (20) bei der Prüfung von *Mycobacterium phlei* im Neutralrot-Test und im Nilblau-Test nach Desbordes. Der apathogene Mycobakterienstamm wurde auf verschiedenen Nährböden (Petragnani-Eiernährböden, Glukose-Agar, synthetischer Agarnährboden) gezüchtet und das cytochemische Verhalten bis zum 22. Versuchs-

tage täglich geprüft. In beiden Testen sind dabei auch positive Reaktionen beobachtet worden. Starke Schwankungen des Reaktionsausfalls, bedingt durch verschiedenes Alter der Kulturen, wurden vor allem beobachtet, wenn die Keime auf relativ phosphorhaltigen Substraten gezüchtet worden waren. Schwierigkeiten traten bei der Beurteilung der Farbreaktionen auch dann auf, wenn die Nährmedien eine Pigmentbildung der Bakterien zuließen.

Die Verfasser sehen sich auf Grund ihrer Untersuchungen zu dem Schluß berechtigt, daß das Verhalten der Mycobakterien in der Neutralrot-Reaktion und dem Nilblau-Test nach dem derzeitigen Stand der Dinge keine Aussage über die den Keimen im Leben eigene Virulenz gestattet.

Rogul, Keller und Cabelli (17) wandten den Neutralrot-Test bei der Untersuchung und Klassifizierung der sog. "chromogenen Mycobakterien" an. Diese Keime, die starke Pigmentbildner und für kleine Versuchstiere gewöhnlich apathogen sind, wurden erst in den letzten Jahren vereinzelt als Erreger menschlicher Tuberkuloseformen gefunden.

Keime, die nur unter Lichteinfluß ein gelbes oder gelb-oranges Pigment bildeten, sog. photochromogene Bakterien, und Keime, die in ihrem Wachstum und ihrer Pigmentbildung durch Licht gehemmt werden, sog. photophobe Bakterien, waren neutralrotpositiv. Im Gegensatz dazu fiel die Neutralrot-Reaktion bei den sog. scotochromogenen Bakterien, das sind Keime, die sowohl in der Dunkelheit als auch im Licht ein gelboranges Pigment bilden, negativ aus.

In Deutschland hat Boenicke (4) bei einem Versuch zur Einteilung der Mycobakterien mit Hilfe einiger chemischer Proben u. a. auch den Neutralrot-Test verwendet. Es wurden 39 verschiedene BCG-Stämme, 51 humane, 12 bovine und 12 aviäre Tuberkelbakterienstämme sowie 15 Stämme säurefester Saprophyten untersucht. Virulente Tuberkelbakterienstämme gaben i. d. R. eine positive Neutralrot-Reaktion. Die BCG-Stämme verhielten sich unterschiedlich. Saprophyten reagierten stets negativ, während sich einige atypische Stämme rosa bis rot färbten. Der Verfasser zog daraus den Schluß, die Neutralrot-Reaktion nicht allein, sondern nur zusammen mit anderen chemischen Proben (Prüfung der Katalase- und Penicillinaseaktivität, Prüfung des Reduktionsvermögens von Methylenblau) anzuwenden.

III. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

A. Material und Methode

In den Untersuchungen wurden folgende Mycobakterienstämme verwendet:

1. Mycobakt. tuberculosis var. hominis¹⁾

1 alter Laborstamm (Tb 1)

47 frisch isolierte Stämme, die nicht mehr als zwei Kulturpassagen hinter sich hatten .

Alle Stämme verhielten sich kulturell eugonisch und waren virulent für Meerschweinchen.

2. Mycobakt. tuberculosis var. bovis

1 BCG-Stamm

1 alter Laborstamm (Ravenel)

54 frisch isolierte Stämme, die nicht mehr als zwei Kulturpassagen hinter sich hatten und aus tierischem und menschlichem Untersuchungsmaterial gezüchtet worden waren.

Alle Stämme mit Ausnahme des BCG-Stammes verhielten sich kulturell dysgonisch und glycerinophob. Sie waren virulent für Meerschweinchen und Kaninchen.

3. Mycobakt. avium

1 alter Laborstamm (W)

21 Stämme, die frisch aus veränderten Organen tuberkulöser Hühner herausgezüchtet worden waren.

Keiner dieser Stämme war für Meerschweinchen virulent, einige führten bei Kaninchen zur septikämischen Form der Tuberkulose.

4. Mycobakt. paratuberculosis (Johne)

9 alte Laborstämme, die mindestens fünf Kulturpassagen hinter sich hatten und in ihren Nährstoffbedürfnissen an Tuberkulosenährboden angepaßt waren.

Die Stämme waren für Meerschweinchen und Kaninchen nicht virulent.

¹⁾ Die Stämme waren zum größten Teil im Rahmen der "Aktion bovine Tuberkulose des Menschen" aus menschlichem Untersuchungsmaterial im Bakteriologischen Institut Warthausen isoliert worden.

5. Säurefeste Saprophyten

- a) 8 Stämme von *Mycobakt. phlei*
3 " " " *lacticola*
2 " " " *specialis*
1 Stamm " *smegmatis*
1 " " *butyricum*
1 " " *giae*
1 " " *minetti*
1 " " *muris* (Vole)
1 " " *rubrum*
1 " " *Berlin*

Alle Stämme hatten bereits mehrere Kulturpassagen mitgemacht.

- b) 22 Stämme frisch aus Milch isoliert
4 " aus tierischem Organmaterial gezüchtet
2 " " menschlichem " "

Die zuletzt aufgeführten 28 Stämme waren noch nicht näher differenziert; es handelte sich aber um schnell wachsende, säurefeste Stäbchen, die für Meerschweinchen nicht virulent waren.

Der Neutralrot-Test nach Dubos und Middlebrook wurde folgendermaßen vorgenommen:

Reagenzien: 50 %iger Methylalkohol
Veronalpuffer nach Michaelis
(20,6 g Veronalnatrium werden in 1000,0 ccm Aq. dest. gelöst; zu dieser Lösung werden 65 ccm 1/10 n HCl gegeben, p_H 8,9)
Wäßrige 0,01 %ige Neutralrotlösung, die vor Gebrauch jedesmal frisch hergestellt wird.

Durchführung: Eine dicke Öse voll Kulturmaterial wurde zweimal in je 1 ccm 50 %igem Methylalkohol gewaschen, wobei die Keime vor dem Zentrifugieren jedesmal eine Stunde bei 37° C stehen gelassen wurden. Die abzentrifugierten Keime wurden dann in 1 ccm des Veronalpuffers resuspendiert. Dieser Keimsuspension wurden einige Tropfen der wäßrigen 0,01 %igen Neutralrotlösung zugegeben. Die Farbe der Bakterien ist dann nach 30 Minuten langem Stehenlassen bei Zimmertemperatur folgendermaßen beurteilt worden:

++++	purpurrot	)	
+++	rot	)	stark positive Reaktion
		)	
++	rosa	)	
+	blaß rosa	)	schwach positive Reaktion
-	gelb	)	negative Reaktion

Das Alter der verwendeten Kulturen betrug bei den pathogenen Mycobakterien i. d. R. 4 - 6 Wochen. Die apathogenen Mycobakterien wurden nach 1 - 6-wöchiger Bebrütung dem Test unterworfen.

Folgende Nährmedien wurden verwendet (Herstellung nach Hallmann, Bakteriologische Nährböden, Thieme-Verlag Stuttgart 1958):

- a) Für die Züchtung der Menschen-, Rinder-, Geflügel-, Paratuberkelbakterien und der säurefesten Saprophyten

Petragnani-Eiernährböden mit Glycerin
 " " ohne Glycerin
 Eiernährböden nach Löwenstein-Jensen
 Gottsacker-Sauton-Eigelbsubstrat

- b) Nur für die Züchtung der säurefesten Saprophyten

Glycerinbouillon mit 4 % Glycerin
 Synthetische Nährlösung nach Long mit und ohne Glycerin
 Glycerinschrägar mit 4 % Glycerin.

B. Untersuchungsergebnisse

1. Vorversuch

In einem orientierenden Vorversuch sollte festgestellt werden, mit welcher Menge Neutralrot eine optimale Färbung der Bakterien bei gleichbleibender Puffermenge zu erzielen ist. Dazu wurden als Keime bekannter Virulenz 2 humane Stämme (Standard-Stamm Tb 1 und der frisch isolierte Stamm 167) und 2 bovine Stämme (1 BCG-Stamm und der frisch herausgezüchtete virulente Stamm 182) mit 2 avirulenten Stämmen (M. phlei 1 und M. phlei R 8a) verglichen.

Die Ergebnisse sind in Tabelle 1 zusammengestellt worden.

Tabelle 1: Neutralrot-Test mit steigender Menge Neutralrot bei gleichbleibender Puffermenge

Stamm	Zahl der zu 1 ccm Puffer zugesetzten Tropfen Neutralrot-Lösung									
	1	2	3	4	5	6	7	8	10	
Tb 1 (human)	++	++	++	+++	+++	++	++++	++++	++++	
167 (human)	+	+	++	++	++	+++	+++	+++	++++	
182 (bovin)	++	++	++	+++	+++	++++	++++	++++	++++	
BCG (bovin)	+	+	+	+	+	+	+	++	++	
M. phlei 1 (avirulent)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
M. phlei R8a (avirulent)	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Aus der Zusammenstellung geht hervor, daß bei einer Menge von 7 Tropfen die Farbunterschiede zwischen den avirulenten, schwach virulenten und virulenten Keimen am deutlichsten ins Auge fielen. Aus diesem Grunde wurde in allen weiteren Versuchen dem Bakterien-Puffergemisch diese Neutralrot-Menge zugesetzt.

2. Hauptversuche

a) 1. Versuchsreihe

In den Untersuchungen von Goldman und Goldman (9) sowie Mariotti (13) hatte sich gezeigt, daß in Abhängigkeit von der Zusammensetzung der Nährböden und des Alters der Kulturen auch bei avirulenten Mycobakterien unter Umständen positive Neutralrot-Reaktionen zustandekommen können. In den folgenden Versuchen wurde deshalb der Neutralrot-Test zunächst bei säurefesten Saprophyten durchgeführt, die auf verschiedenen Nährmedien verschieden lang bebrütet worden waren. Zum Vergleich sind daneben auch einige der pathogenen Mycobakterienarten, die unter verschiedenen kulturellen Bedingungen gezüchtet wurden, untersucht worden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen sind in den Tabellen 2, 3, 4 und 5 zusammengestellt worden.

o bedeutet "nicht untersucht".

Tabelle 2: Neutralrot-Test bei verschiedenen alten Kulturen apathogener säure-fester Saprophyten auf festen Nährböden

Lfd. Nr.	Stamm	Kultur auf Glycerin- Schrägagar						Kultur auf Petragrani mit Glycerin					
		Neutralrot-Reaktion nach Wochen:						Neutralrot-Reaktion nach Wochen:					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
1	M. phlei 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	"- 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	"- 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	"- 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	"- 5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	"- 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	"- 7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	"- R 8a	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	M. lactiola 23	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
10	" 24	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	" 25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	M. spec. 36	-	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
13	"- 37	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+
14	M. muris (Vole)	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	M. minetti	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	M. rubrum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	M. butyricum	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	M. Berlin	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	M. giae	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	M. smegmatis	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stämme aus Milch

21	M. 8	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
22	M 3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	M 23	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	M K 10	+	+	+	0	+	+	+	+	+	+	+	+
25	M 141	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
26	M 4	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
27	M 237	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
28	M 211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
29	M 172	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
30	M 210	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
31	M 144	+	+	+	-	-	-	+	-	+	+	+	+

Fortsetzung Tabelle 2

Lfd. Nr.	Stamm	Wochen:						Wochen:					
		1	2	3	4	5	6	1	2	3	4	5	6
32	M 177	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
34	M 200	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
35	M 162	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
36	M 224	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
37	M 228	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
38	M 253	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
39	M 259	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
40	M "R"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
41	M 239	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
42	M 236	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
43	M 238	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stämme aus tierischen Organen

44	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
45	Maier	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
46	2961	o	o	o	+	+	+	o	o	o	o	+	+
47	CM 39	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Stämme aus menschlichen Organen

48	"D"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
49	"Z"	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
50	"120 II"	-	-	+	+	+	+	o	-	-	-	+	+

Tabelle 3: Neutralrot-Test bei apathogenen säurefesten Saprophyten auf verschiedenen flüssigen Nährböden

Lfd. Nr.	Stamm	Neutralrot-Reaktion bei Kulturen aus		
		Glyzerin-Bouillon	Long-Substrat	
			mit Glyz.	ohne Glyz.
1	M. phlei 1	-	-	-
2	" 2	-	-	-
3	" 3	-	-	-
4	" 4	-	-	-
5	" 5	-	-	-
6	" 6	-	-	-
7	" 8	-	-	-
8	" R 8a	-	-	-
9	M. lacticola 23	-	-	-
10	" 24	-	-	-
11	" 25	-	-	-
12	M. spec. 36	-	+	-
13	" 37	-	+	-
14	M. muris (Vole)	-	-	-
15	M. minetti	-	-	-
16	M. rubrum	-	-	-
17	M. butyricum	+	+	+
18	M. Berlin	-	-	-
19	M. giae	-	-	-
20	M. smegmatis	-	-	-

Stämme aus Milch

21	M 8	-	-	-
22	M 3	-	-	-
23	M 20	-	-	-
24	M "K 10"	+	+	+
25	M 141	-	-	-
26	M 4	-	+	+
27	M 237	-	-	-
28	M 211	-	-	-
29	M 172	-	+	+
30	M 210	-	-	-
31	M 144	-	+	+
32	M 177	-	-	-

Fortsetzung Tabelle 3

Lfd. Nr.	Stamm	Glyzerin-Bouillon	Long-Substrat	
			mit Glyz.	ohne Glyz.
33	M 254	-	-	-
34	M 200	+	-	-
35	M 162	-	-	-
36	M 224	-	+	+
37	M 228	-	-	-
38	M 253	-	+	+
39	M 259	+	+	-
40	M "R"	-	-	-
41	M 239	-	-	-
42	M 236	-	-	-
43	M 238	-	-	-
<u>Stämme aus tierischen Organen</u>				
44	50	-	-	-
45	Maier	-	-	-
46	2961	-	-	-
47	CM 39	-	-	-
<u>Stämme aus menschlichen Organen</u>				
48	"D"	o	o	o
49	"Z"	-	-	-
50	"12o II"	+	+	+

Tabelle 4: Neutralrot-Test bei verschieden alten Kulturen von Geflügel-tuberkelbakterien auf festen Nährböden

Stamm	Züchtung auf							
	Petraghani mit Glyzerin				Löwenstein-Jensen			
	Neutralrot-Reaktion				Neutralrot-Reaktion			
	nach Wochen :				nach Wochen:			
	2	3	4	5	2	3	4	5
Av 1	+	+	+	+	+	+	+	+
Av 3	+	+	-	-	++	++	+	+
Av 4	+	-	-	-	+	-	-	-
Av 5	+	-	-	-	+	++	++	-
Av 7	-	+	-	-	-	-	+	+
Av 8	+	++	+	-	-	-	+	+
Av 9	+	+	+	-	+	+	+	++
Av 10	++	+	+	-	+	-	-	+
Av 11	+	+	+	-	+	+	+	+
Av 12	+++	++	++	+	+++	+++	+++	+++
Av 18	-	+	+	-	0	+	+	+
Av 27	+++	++	++	+	+++	++	+++	++
Av 30	+	+	+	-	-	-	+	+
Av 32	++	+	++	+	+++	+++	++	++
Av 33	-	+	+	-	-	-	-	+
Av 97	-	-	0	0	-	+	-	0
Av 99	+	+	+	-	-	-	-	-
Av 131 A	-	-	+	-	+	+	+	-
Av 178	+	+	++	-	-	-	-	-
Av "W"	++	+	+	-	+++	++	-	0

Tabelle 5: Neutralrot-Test bei humanen und bovinen Tuberkelbakterien auf Nährböden mit verschiedenem Glyzeringehalt

Stamm	Ausfall der Neutralrot-Reaktion bei Züchtung auf			
	Petragnani mit 3 % Glyz.	Petragnani ohne Glyz.	Löwenstein-Jensen mit 0,75 % Glyz.	Gottsacker-Sauton mit 1,5 % Glyz.
<u>Var. hominis</u>				
Tb 1	++++	+++	+++	+++
H 208	+++	+++	+++	+++
H 210	+++	+++	++++	++++
H 221	+++	++	+++	++++
<u>Var. bovis</u>				
Ravenel	+++	+++	+++	+++
B 135	o	++++	++++	+++
B 147	o	+++	+++	+++
B 149	o	++++	++++	+++
B 150	o	++++	++++	++++
B 182	++++	++++	++++	++++
B 188	++++	++++	++++	++++
B 204	++++	++++	++++	++++
B 215	+++	++++	++++	++++
B 216	+++	++++	+++	+++
BCG	++	+	++	++

b) Besprechung der Untersuchungsergebnisse

Neutralrot-Test bei apathogenen säurefesten Mycobakterien:

Bei der Neutralrot-Reaktion an 50 Stämmen säurefester Saprophyten auf festen Nährböden (Tab. 2) behielten insgesamt 38 Stämme im Verlaufe der Untersuchungen unter verschiedenen Bedingungen ihre ursprüngliche gelbe Färbung bei; sie reagierten also negativ. Bei 12 Stämmen kam es mehr oder weniger regelmäßig zu einer schwachen Rotfärbung (+ = blaßrosa) der Bakterien.

6 Stämme zeigten diese Färbung sowohl nach Züchtung auf Glyzerinschrägagar als auch auf Petragnani-Nährböden. 4 Stämme reagierten nur auf dem Glyzerinagar und 2 Stämme nur auf dem Petragnani-Medium.

Bei den im Neutralrot-Test schwach rot reagierenden Mycobakterien waren 2 Stämme (lfd. Nr. 13 und 24) konstant und 2 Stämme (lfd. Nr. 31 und 46) nahezu regelmäßig während der 6-wöchigen Bebrütungsdauer positiv. 3 Stämme (lfd. Nr. 14, 32, 36) reagierten nur im Alter von 1 - 3 Wochen, 2 Stämme (lfd. Nr. 21 und 28) nur nach 4 - 6 Wochen langer Bebrütung.

Bei Züchtung auf bzw. in flüssigen Nährböden (Tab. 3) reagierten in derselben schwach positiven Weise ebenfalls 12 Stämme. Nur in 7 Fällen handelte es sich dabei jedoch um Keime, die auch auf festen Nährböden reagiert hatten. 5 Stämme (lfd. Nr. 17, 26, 29, 34, 39) wiesen nur nach Züchtung im flüssigen Milieu eine Rotfärbung auf. Am häufigsten traten Reaktionen bei Keimen aus dem Longschen Substrat mit Glycerin (3 %) auf, nämlich in 11 Fällen. Bei Bakterien aus dem Longschen Substrat ohne Glycerin kam es bei 8 Stämmen, aus Glycerinbouillon nur bei 5 Stämmen zur Rotfärbung. Übereinstimmend in allen drei Medien haben die Stämme Nr. 17, 24 und 50 reagiert, übereinstimmend auf Long mit und ohne Glycerin die Stämme 26, 29, 31, 36, 38 und gemeinsam auf Long mit Glycerin und Glycerinbouillon nur der Stamm 39.

Die Beurteilung der Versuche zeigt als wichtigstes Ergebnis, daß deutliche positive Neutralrot-Reaktionen, wie sie für virulente Tuberkelbakterien kennzeichnend sind, in keinem Falle auftraten. Damit werden die Ergebnisse anderer Untersucher (4, 6, 11, 16, 17, 19, 20) im wesentlichen bestätigt. Die untersuchten Stämme der säurefesten Saprophyten waren, wie vorausgegangene Prüfungen am Bakteriologischen Institut Warthausen und im Tierhygienischen Institut der Universität München ergeben hatten, für Meerschweinchen avirulent. Bei der subkutanen Verabreichung in der Menge von 1 mg Keimmateriel war es im höchsten Falle zu vorübergehenden Schwellungen der regionären Kniefaltensymphknoten gekommen; andere Veränderungen sind nicht beobachtet worden. Der negative Ausfall der Neutralrot-Reaktion bzw. eine zuweilen vorkommende schwach positive Reaktion scheint demnach ein sehr zuverlässiges Kriterium, zumindest für die Meerschweinchen-Avirulenz der säurefesten Saprophyten zu sein. Signifikante Unterschiede zwischen älteren, bereits differenzierten Stämmen (lfd. Nr. 1 - 20) und frisch isolierten Stämmen (lfd. Nr. 21 - 50) wurden dabei nicht beobachtet.

Einen Einfluß des Alters der verwendeten Keime auf den Ausfall der Neutralrot-Reaktion konnte ich nicht feststellen. Schwach positive Reaktionen sind sowohl bei den jungen als auch bei alten Kulturen aufgetreten. Das steht in einem gewissen Gegensatz zu den Ergebnissen von Pirotta und Pedrazzi (15), die bei M. phlei starke Schwankungen des Reaktionsausfalls in Abhängigkeit vom Alter der Keime festgestellt haben. Als Ursache dieser Diskrepanz sehe ich den Umstand an, daß die Italiener phosphorhaltige Nährmedien verwendeten und ge-

rade bei relativ hohem Phosphorgehalt starke Reaktionen beobachten konnten. In meinen Versuchen enthielten die Nährböden geringere Phosphatmengen. Erwähnt werden muß in diesem Zusammenhang allerdings auch, daß ich die Neutralrot-Reaktion bei Keimen durchführte, die mindestens eine Woche alt waren. Es ist durchaus möglich, daß bei Untersuchungen zu einem früheren Zeitpunkt, etwa nach 2- oder 3-tägiger Bebrütung, stärkere und auch häufigere positive Reaktionen zustande gekommen wären. Die Versuchsergebnisse von Goldman und Goldman (9) machen dies sogar wahrscheinlich.

Einen deutlichen Einfluß des Nährmilieus auf den Ausfall des Neutralrot-Testes konnte ich bei den von mir benützten Substraten nicht feststellen. Vergleicht man allerdings die Ergebnisse mit dem glyzerinhaltigen und glyzerinfreien Medium nach Long, dann scheint es, als hätte das Glycerin den positiven Reaktionsausfall etwas begünstigt. Ich glaube aber, daß diese Erscheinung im Grunde auf etwas anderem beruht, nämlich auf der Wirkung des Glycerins auf die Pigmentbildung der Keime. Für diese Vermutung spricht einmal, daß bei säurefesten Saprophyten die Pigmentbildung durch Glycerin gefördert werden kann (Schließer, mündliche Mitteilung) und zum anderen die eigene Beobachtung, daß es sich bei 6 der schwach positiv reagierenden Stämme (lfd. Nr. 12, 13, 21, 24, 46, 50) um zum Teil starke Bildner von rotem oder orange-rotem Pigment gehandelt hat. Gerade bei solchen Stämmen dürfte aber eine gewisse Unsicherheit in der Beurteilung geringgradiger Rotfärbungen von Bakterien im Neutralrot-Test unvermeidbar sein. Auf diese Tatsache haben auch Pirotta und Pedrazzi (15) bereits hingewiesen.

Unterschiede im Ausfall der Neutralrot-Reaktion zwischen Keimen, die auf festen und flüssigen Nährböden gezüchtet worden waren, beobachtete ich im Gegensatz zu Morse, Dail und Olitzky (14) nicht. Diese Autoren hatten gefunden, daß eine Züchtung der Keime auf festem Milieu den positiven Ausfall der Probe im Vergleich zu in flüssigen Substraten kultivierten Keimen erschwert.

Zusammenfassend ergibt sich somit folgendes:

1. Bei 50 schnell wachsenden Mycobakterienstämmen, die für Meerschweinchen avirulent waren, kam es bei der Neutralrot-Reaktion nach Dubos und Middlebrook in keinem Fall zu einer ausgeprägten Rotfärbung (Beurteilung +++ bzw. ++++) der Keime.
2. Bei 12 Stämmen traten im Verlaufe wiederholter Untersuchungen schwach positive Reaktionen (Beurteilung +) auf, bei denen die Keime blaßrosa gefärbt waren. 4 Stämme davon reagierten nahezu konstant während einer 6-wöchigen Bebrütungsdauer. 8 Stämme reagierten mehr oder weniger unregelmäßig im Verlauf der 6-wöchigen Beobachtungszeit.

3. Der Ausfall der Reaktionen ist durch verschiedene Nährböden (Glyzerinagar, Petragnani-Nährböden, Glyzerinbouillon, synthetische Nährlösung nach Long mit und ohne Glyzerin) nicht eindeutig beeinflußt worden. Auch das Alter der verwendeten Kulturen (1 - 6 Wochen) wirkte sich auf den Neutralrot-Test nicht aus.
4. Bei der Beurteilung des Ausfalls der Neutralrot-Reaktion ist zu beachten, daß u.U. das rote oder orange-rote Eigenpigment säurefester Saprophyten schwach positive Reaktionen vortäuschen kann.
5. Unterschiede im Ausfall der Neutralrot-Reaktion zwischen älteren Laboratoriumstämmen und frisch isolierten Stämmen wurden nicht beobachtet.

Neutralrot-Test bei Geflügeltuberkelbakterien

Insgesamt wurden 20 Stämme, die auf Petragnani-Nährböden mit Glyzerin und auf Löwenstein-Jensen-Nährböden gezüchtet worden sind, nach 2-5-wöchiger Bebrütung im Neutralrot-Test untersucht. Alle Stämme zeigten im Verlaufe dieser Zeit mehr oder weniger starke und konstante Reaktionen.

Stark positive Reaktionen (Beurteilung +++) traten bei 4 Stämmen auf; zweimal übereinstimmend bei Keimen, die auf beiden Nährböden gezüchtet worden sind und zweimal allein bei Keimen, die auf Löwenstein-Jensen-Nährböden gewachsen waren. In einem Fall (Av 12) blieb die +++ - Reaktion während der 2 - 5-wöchigen Bebrütung konstant, in allen anderen Fällen trat sie nur am Beginn der Beobachtungszeit auf.

Bei den übrigen 16 Stämmen handelte es sich um schwach positive Reaktionen (Beurteilung +, ++). Ein hinsichtlich der Stärke übereinstimmender Reaktionsausfall auf beiden Nährböden bestand bei 8 Stämmen. In 4 Fällen ist die Reaktion bei auf Löwenstein-Jensen gezüchteten Keimen stärker ausgefallen und in 4 Fällen bei den Stämmen, die auf Petragnani-Nährböden gezüchtet wurden. Bei den zuletzt genannten Stämmen sind die Reaktionen im allgemeinen in den ersten Wochen der Beobachtungszeit zustande gekommen; auf Löwenstein-Jensen sind die Reaktionen dagegen ziemlich unregelmäßig über die Versuchsdauer verteilt aufgetreten.

Bei der Beurteilung der Versuche muß zunächst herausgestellt werden, daß im Gegensatz zu den säurefesten Saprophyten alle Geflügeltuberkelbakterienstämme eine positive Neutralrot-Reaktion gezeigt haben. Auffallend sind aber die starken Schwankungen im Reaktionsausfall bei den verschiedenen Stämmen. Alle Stämme hatten sich für Meerschweinchen mehr oder weniger avirulent erwiesen. Bei subkutaner Infektion kam es zu Schwellungen der regionären Kniefaltenlymphknoten, die allerdings stärker ausgeprägt waren als bei den säurefesten

Saprophyten. Tuberkulöse Veränderungen in den Organen konnten aber in keinem Falle beobachtet werden. Für Hühner waren diese Stämme aber zweifellos virulent; denn sie sind - mit einer Ausnahme (131 A) - aus veränderten Organen tuberkulöser Hühner isoliert worden. Ein Teil der Stämme wurde auch an Kaninchen geprüft. Die Stämme 97, 99, 131 A und 178 riefen bei intravenöser Infektion (0,01 mg Keime) eine tuberkulöse Septikämie hervor, an der die Kaninchen im Laufe von durchschnittlich 3 Wochen starben. Bei der Sektion wurden hochgradige Milz- sowie Leberschwellung und in mikroskopischen Präparaten massenhaft säurefeste Stäbchen festgestellt (Schließer, mündliche Mitteilung). Gerade diese Stämme haben aber nun im Neutralrot-Test mit am schwächsten reagiert. Dies zeigt somit deutlich, daß der cytochemische Virulenztest keineswegs mit der biologischen Virulenz parallel zu gehen braucht. Eine Erklärung für die starken Schwankungen im Ausfall des Neutralrot-Testes bei den verschiedenen Stämmen der Geflügeltuberkelbakterien kann nicht gegeben werden. In Unterschieden der Virulenz für Hühner und Versuchstiere können sie auf alle Fälle nicht bestanden haben. Methodische Fehler können ebenfalls kaum dafür verantwortlich gemacht werden, da für die vergleichenden Untersuchungen stets die gleichen Reagenzien verwendet wurden.

Zusammenfassend ergibt sich folgendes:

1. 20 Geflügeltuberkelbakterienstämme haben im Neutralrot-Test bei wiederholten Untersuchungen mehr oder weniger stark positiv reagiert.
2. Stark positive Reaktionen (+++) traten bei 4 Stämmen, schwach positive Reaktionen (+, ++) bei 16 Stämmen auf.
3. Junge Kulturen reagierten im allgemeinen etwas stärker positiv als alte. Ein signifikanter Einfluß des Nährmilieus auf den Ausfall der Reaktion konnte nicht festgestellt werden.
4. Schwach positiv reagierende Stämme, die für Meerschweinchen avirulent waren, erwiesen sich für Kaninchen als virulent.

Neutralrot-Test bei Menschen- und Rindertuberkelbakterien

Der Neutralrot-Test wurde bei 4 humanen und 11 bovinen Tuberkelbakterienstämmen, die 6 Wochen lang auf den gebräuchlichsten Tuberkulose-Nährböden (Petragiani mit und ohne Glycerin, Löwenstein-Jensen, Gottsacker) bebrütet worden waren, vergleichend durchgeführt. Mit Ausnahme des BCG-Stammes, der nur eine schwach positive Reaktion (++) ergab, reagierten alle anderen Stämme stark positiv.

Bei den humanen Stämmen, bei denen insgesamt 16 Reaktionen vorgenommen wurden, handelte es sich 6mal um ++++ -Reaktionen, 9mal um +++ -Reaktionen und 1mal um eine ++ -Reaktion. Auf glyzerinfreien Nährböden gezüchtete Keime reagierten in keinem Falle mit ++++, auf Petraghani mit Glycerin gezüchtete in einem Falle, auf Löwenstein-Jensen und Gottsacker kultivierte in 3 Fällen.

Bei den bovinen Stämmen, bei denen insgesamt 40 Reaktionen durchgeführt wurden, handelte es sich 23mal um ++++ -Reaktionen, 13mal um +++ -Reaktionen und 4mal um ++ -Reaktionen. Auf glyzerinfreien Petraghani-Nährböden gezüchtete Keime reagierten 8mal mit ++++, auf Löwenstein-Jensen gezüchtete 5mal, auf Gottsacker gezüchtete 6mal und auf Petraghani mit Glycerin kultivierte Keime 2mal. Die schwach positiven Reaktionen (++) kamen nur bei dem BCG-Stamm vor.

Die Beurteilung der Versuche zeigt, daß zwischen den 2 Variationen der Tuberkelbakterien und den anderen untersuchten Mycobakterien deutliche Unterschiede bestehen. Nur der BCG-Stamm, der ja eine abgeschwächte virulente Form eines bovinen Stammes darstellt und bei Meerschweinchen keine generalisierte Tuberkulose hervorzurufen vermag, reagierte schwach positiv. Alle anderen humanen und bovinen Stämme, die sowohl für Meerschweinchen als auch zweifellos für Menschen bzw. Rinder virulent waren, reagierten stark positiv. Dabei hatte es den Anschein, als würden im allgemeinen bei den Rindertuberkelbakterien noch etwas intensivere Rotfärbungen zustande kommen als bei den Menschentuberkelbakterien. Unterschiede im Verhalten der Keime, die auf verschiedenen Nährböden gezüchtet worden waren, konnte ich kaum beobachten. Daß die bovinen Stämme vor allem auf dem glyzerinfreien Substrat am häufigsten ++++ -Reaktionen gegeben hatten, hat seine Ursache sicher in der bekannten hemmenden Wirkung des Glycerins auf das Wachstum dieser Keimart.

Zusammenfassend ergibt sich somit folgendes:

1. 4 humane und 10 bovine Tuberkelbakterienstämme, die auf verschiedenen festen Tuberkulose-Nährböden gezüchtet wurden, reagierten im Neutralrot-Test in allen Fällen stark positiv (+++, ++++).
2. 1 BCG-Stamm (bovin) reagierte stets schwach positiv (++).
3. Die bovinen Stämme zeigten im Durchschnitt eine etwas intensivere Rotfärbung als die humanen Stämme.

c) 2. Versuchsreihe

In dieser Versuchsreihe wurden Stämme von *Mycobacterium tuberculosis* var. *hominis* und *bovis* sowie Paratuberkulose-Stämme, die jeweils nur auf einem Nährboden gleich lang bebrütet worden waren, im Neutralrot-Test untersucht. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind unter Berücksichtigung der bei der Erstisolierung festgestellten Virulenz für Meerschweinchen in den Tabellen 6, 7 und 8 zusammengestellt worden.

Tabelle 6: Neutralrot-Reaktion bei *Mycobacterium tub.* var. *hominis*

Bezeichnung der Stämme	Virulenz für Meerschwein- chen bei Erstisolierung	Beurteilung der Neutralrot-Reaktion
H 12	General- Tuberk.	+++
H 35	"	+++
H 39	"	+++
H 48	"	++++
H 51	"	++++
H 60	"	++++
H 61	"	+++
H 72	"	++++
H 81	"	+++
H 82	"	+++
H 100 B	"	+++
H 101 B	Tbc. des reg. Lymphsystems	++
H 102	General. Tuberk.	+++
H 103 B	"	+++
H 106	"	++
H 110	"	++++
H 112 B	"	+++
H 113 B	"	++++
H 114 B	"	++++
H 115	"	++++
H 119	"	++++
H 127	"	+++
H 128	"	+++
H 137 A	"	+++
H 140	"	+++
H 141 A	"	+++
H 144 B	"	+++

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 6

Bezeichnung der Stämme	Virulenz für Meerschwein- chen bei Erstisolierung	Beurteilung der Neutralrot-Reaktion
H 146 A	General. Tuberk.	+++
H 147 A	"	+++
H 149 A	"	+++
H 150 A	"	+++
H 152 A	"	+++
H 153	"	+++
H 154 A	"	+++
H 154 B	"	+++
H 155	"	+++
H 157	"	+++
H 159 B	"	+++
H 162	"	+++
H 164	"	+++
H 167 A	"	+++
H 169	"	++++
H 174	"	++++
H 176	"	+++
H 208	"	+++
H 221	"	+++

Tabelle 7: Neutralrot-Reaktion bei Mycobacterium tub. var. bovis

Bezeichnung der Stämme	Virulenz für Meerschwein- chen bei Erstisolierung	Beurteilung der Neutralrot-Reaktion
B 17	General. Tuberk.	++++
B 22	"	++++
B 24	"	+++
B 36	"	+++
B 37	"	+++
B 48	"	+++
B CM 51	"	+++
B 53	"	+++
B 54	"	+++
B 83	"	++++

Fortsetzung

Fortsetzung Tabelle 7

Bezeichnung der Stämme	Virulenz für Meerschwein- chen bei Erstisolierung	Beurteilung der Neutralrot-Reaktion
B 85	General. Tuberk.	++++
B 86	"	++++
B 91	"	++++
B 92 B	"	+++
B 97	"	+++
B 105 B	"	+++
B 109	"	++++
B 113	"	+++
B 117 B	"	+++
B 118	Tbc. des reg. Lymphsystems	++
B 120 B	General. Tuberk.	+++
B 121 B	"	++++
B 126 B	"	++++
B 132 A	"	++++
B 135	"	++++
B 138	"	++++
B 139	"	+++
B 147	"	++++
B 151	"	++
B 152 B	"	+++
B 153	Tbc. des reg. Lymphsystems	++
B 157	"	++
B 158	General. Tuberk.	++++
B 160	"	++++
B 161	"	+++
B 166 B	"	+++
B 167 B	"	+++
B 168 B	"	+++
B 181	"	+++
B 182	"	+++
B 185	"	++++
B 188	"	++++
B 201	"	++++
B 204	"	++++
B 205	"	++++
B 215	"	+++
B 216	"	+++
B 221	"	++++
B S 19	"	++++

Tabelle 8: Neutralrot-Reaktion bei *Mycobacterium paratuberculosis* (Johne)

Bezeichnung der Stämme	Virulenz für Meerschweinchen	Beurteilung der Neutralrot-Reaktion
C 286	Tbc. d. Kniefaltenly.	++
C 300	"	+
3384	"	+++
3390	"	+++
P II	"	+++
P III	"	+++
P IV	"	++
P V	"	++
C Hull	"	++

d) Besprechung der Ergebnisse

Bei 46 untersuchten humanen Stämmen kam es in 11 Fällen zu ++++ -Reaktionen, in 33 Fällen zu +++ -Reaktionen und in 2 Fällen zu ++ -Reaktionen. Negative Reaktionen traten nicht auf. Alle 44 Stämme, die stark positiv reagierten, haben auch bei ihrer Erstisolierung aus menschlichem oder tierischem Untersuchungsmaterial bei Meerschweinchen eine generalisierte Tuberkulose hervorgerufen. Cytochemischer und biologischer Virulenztest stimmten in diesen Fällen also überein. Von den schwach reagierenden 2 Stämmen haben sich einer als abgeschwächt virulent, der andere als virulent für Meerschweinchen erwiesen. Hier stimmten Neutralrot-Test und Tierversuch nur in einem Falle überein.

Bei den 49 untersuchten bovinen Stämmen kam es in 22 Fällen zu ++++ -Reaktionen, in 23 Fällen zu +++ -Reaktionen und in 4 Fällen zu ++ -Reaktionen. Negative Reaktionen sind nicht vorgekommen. Die 45 stark positiv reagierenden Stämme haben sich für Meerschweinchen als virulent erwiesen. In diesen Fällen stimmten in vitro- und in vivo-Prüfungen der Virulenz somit überein. Die Intensität der Rotfärbungen war bei den bovinen Stämmen im ganzen betrachtet etwas stärker als bei den humanen Stämmen. Durch diesen Befund, der sich in der ersten Versuchsreihe schon andeutete, werden die Angaben von S toll (20) bestätigt. Von den schwach positiv reagierenden 4 Stämmen rief einer generalisierte Tuberkulose bei Meerschweinchen hervor, die anderen 3 Stämme haben bei der Erstisolierung nur zur Tuberkulose der Kniefalten- sowie äußeren und inneren Leistenlymphknoten geführt.

Bei den 9 Paratuberkulosestämmen ist es in 4 Fällen zu stark positiven (+++) und in 5 Fällen zu schwach positiven (+, ++) Reaktionen gekommen. Negativ reagier-

te keiner der Stämme. Im Meerschweinchenversuch hatten sich alle diese Stämme als avirulent erwiesen. Die subkutane Infektion führte nur zu einer Schwellung der Kniefaltensymphknoten, in deren eitrigem Inhalt mikroskopisch nach 8 Wochen vereinzelt säurefeste Stäbchen nachgewiesen werden konnten. Andere Veränderungen tuberkulöser Art wurden in keinem Falle festgestellt.

Bei einer vergleichenden Beurteilung der Ergebnisse muß zunächst die Tatsache vorangestellt werden, daß bei den virulenten humanen und bovinen Tuberkelbakterien der Neutralrot-Test mit Ausnahme von 2 Fällen stark positiv ausgefallen ist, also bei 91 Stämmen 89mal. Diese Tatsache zeigt ohne Zweifel, daß bei solchen Stämmen die cytochemische Reaktion in sehr hohem Maße mit den Ergebnissen von Virulenzprüfungen in Tierversuchen übereinstimmt. Einen negativen Ausfall der Neutralrot-Reaktion konnte ich nie beobachten. In dem Grad der Rotfärbung der Keime scheinen sich auch gewisse Abstufungen der biologischen Virulenz auszudrücken. Das zeigen nicht nur die Ergebnisse mit dem BCG-Stamm in der 1. Versuchsreihe, sondern auch die anderen 4 Fälle, in denen schwach positive Reaktionen bei humanen und bovinen Stämmen vorgekommen sind, die für Versuchstiere eine herabgeminderte Virulenz besaßen.

Bei weitem nicht so eindeutig fällt nun aber der Vergleich zwischen cytochemischem und biologischem Virulenz-Test bei den Paratuberkelbakterien aus. Wie schon bei den Geflügeltuberkelbakterien, traten auch hier zwischen einzelnen Stämmen relativ große Reaktionsunterschiede auf, die von ganz schwach positiv (+) bis stark positiv (+++) reichten. Für Meerschweinchen waren die Paratuberkelbakterien aber avirulent, denn eine Vermehrung der Keime mit einer fortschreitenden Erkrankung erfolgte nicht. Dabei hat es sich bei den untersuchten Keimen um sehr alte Stämme gehandelt, die schon vor Jahren aus Darmteilen bzw. Darmlymphknoten erkrankter Rinder auf phleihaltigen Spezialnährböden isoliert und seitdem laufend überimpft worden waren. Auch durch die dauernden Kulturpassagen ist es offensichtlich nicht zu einem einschneidenden Verlust des Neutralrot-Bindungsvermögens gekommen.

Zusammenfassend kann festgestellt werden:

1. Für Meerschweinchen virulente Tuberkelbakterien (45 humane und 46 bovine Stämme) reagierten in 97,8 % der Fälle stark positiv (+++ bzw. ++++). 4 abgeschwächt virulente Stämme reagierten schwach positiv (++)
2. Von 9 Paratuberkulosestämmen, die für Meerschweinchen avirulent waren, reagierten 4 Stämme stark (+++) und 5 Stämme schwach (+, ++) positiv.

IV. SCHLUSSZUSAMMENFASSUNG

Im Neutralrot-Test nach Dubos und Middlebrook wurden pathogene und apathogene Mycobakterien untersucht. Die Untersuchungen ergaben:

1. Tuberkelbakterien (45 humane und 46 bovine Stämme), die für Meerschweinchen virulent waren, reagierten in 97,8 % der Fälle stark positiv (Beurteilung +++ bzw. ++++). Für Meerschweinchen abgeschwächt virulente Tuberkelbakterien (1 humaner, 3 bovine, 1 BCG-Stamm) reagierten schwach positiv (Beurteilung ++). Virulente bovine Tuberkelbakterien zeigten im Durchschnitt eine etwas intensivere Rotfärbung als humane Stämme.
2. Geflügeltuberkelbakterien (20 Stämme), die für Meerschweinchen avirulent waren, reagierten bei wiederholten Untersuchungen schwach (+, ++) bis stark (+++) positiv.
3. Paratuberkulosebakterien (9 Stämme), die für Meerschweinchen avirulent waren, verhielten sich ähnlich wie die aviären Stämme. 4 Stämme reagierten stark und 5 Stämme schwach positiv.
4. Von 50 Stämmen säurefester Saprophyten, die für Meerschweinchen avirulent waren, reagierten 38 Stämme konstant negativ. Bei 4 Stämmen traten während einer 1- bis 6-wöchigen Bebrütungszeit auf verschiedenen festen und flüssigen Nährmedien konstante und bei 8 Stämmen vereinzelt schwach positive Reaktionen (+) auf. In einigen Fällen wurde dieser Reaktionsausfall durch die Pigmentbildung der Keime verursacht.
5. Die Untersuchungen zeigten, daß negative Reaktionen bei pathogenen Mycobakterien nicht vorkamen, positive Reaktionen dagegen bei Keimen sehr verschiedener Virulenz auftraten. Zur Bestimmung der Virulenz von Mycobakterien kann daher der in vitro-Test den in vivo-Test (Tierversuch) nicht ersetzen.

V. S C H R I F T T U M

1. Asselineau, J. und E. Lederer: Zit. nach Kölbel (12)
2. Beeuwkes, H.: The use of an egg agar medium with neutral red for the differentiation between *M. tuberculosis* and acidfast saprophytes
Antonie van Leeuwenhoek 22, 304 (1956)
3. Bloch, H.: Enzymatic characteristics of suspensions of different mycobacteria
Amer. Rev. Tbc. 61, 270 (1950)
4. Boenicke, R.: Versuch zur Einteilung der Mycobakterien mit Hilfe einiger chem. Proben
Bull. Union Internat. contre Tbc. 27, 151 (1957)
5. Brodhage, H.: Erstisolierung von Tbc-Bazillen aus patholog. Material auf festem Dubos-Nährboden
Z. Hyg. 132, 105 (1951)
6. Buchanan, G.: The neutral red cytochemical test for determining the virulence of mycobacteria with observations on its modification
S. Afric. J. Med. Sci. 20, 73 (1955)
Ref. Zbl. Tbk. Forsch. 72, 168 (1956)
7. Desbordes, J. und E. Fournier: Etudes de physiologie bactérienne
La virulence des mycobactéries
Revue d'Immunologie 18, 50 (1954)
8. Dubos, R. J. und G. Middlebrook: Cytochemical reaction of virulent tubercle bacilli
Amer. Rev. Tbc. 58, 698 (1948)
9. Goldman, Elise und D. S. Goldman: Cording and neutral red reaction of two avirulent strains of mycobacterium
Amer. Rev. Tbc. 73, 674 (1956)
10. Grassi, C. und F. Caiani: Untersuchung über die Methoden des Virulenz-nachweises der Tbc-Stämme
Ref. Zbl. Tbk. Forsch. 70, 188 (1955/56)
11. Hauduroy, P. und Y. Posternak-Gallia: Zit. nach Brodhage (5)

12. Kölbel, H.: Zum Wert und Reaktionsmechanismus des Neutralrot-Testes
Z. Hyg. 143, 387 (1957)
13. Mariotti, A.: Der cytochemische Test bei der Virulenzbestimmung des Mycobact. tuberculosis
Ref. Zbl. Tbk. Forsch. 72, 320 (1956)
14. Morse, W. C., M. C. Dail und I. Olitzky: A study of the neutral red reaction for determining the virulence of mycobacteria
Amer. J. Pub. Health 43, 36 (1953)
15. Pirotta, F. und G. Pedrazzi: Beitrag zum Studium der in vitro bestimmbaren Virulenz der Mycobakterien II. Mit.
Ref. Zbl. Bakter. I. Ref. 166, 496 (1958)
16. Richmond, L. und M. M. Cummings: An evaluation of methods of testing virulence of acid-fast bacilli
Amer. Rev. Tbc. 62, 632 (1950)
17. Rogul, M., R. Keller und V. J. Cabelli: The classification and susceptibilities to chemotherapeutic agents of chromogenic acid-fast bacilli
Amer. Rev. Tbc. 76, 697 (1957)
18. Schrödter, Sigrid: Beobachtungen bei Anwendung des Neutralrottestes nach Dubos
Zbl. Bakter. I. Orig. 164, 120 (1955)
19. Stoll, L.: Zur Differenzierung pathogener und apathogener Mycobakterien
Lebensmitteltierarzt 4, 274 (1953)
20. Stoll, L.: Die Neutralrotreaktion nach Dubos in der Tb-Diagnostik
Mh. Vet. Med. 9, 278 (1954)
21. Wilson, F. J. und Kalish: Amer. Rev. Tbc. 65, 187 (1952)

Herrn Professor Dr. A. Meyn, Vorstand
des Tierhygienischen Instituts der Univer-
sität München, danke ich herzlich für die
Überlassung des Themas und die freundli-
che Unterstützung bei der Anfertigung der
Arbeit.

L E B E N S L A U F

Am 25. Juli 1926 wurde ich als Sohn des Kammermusiklers und Schauspielers Karl Schöpp und seiner Ehefrau Therese, geb. Neumayer in Regensburg (Oberpfalz) geboren. Meine Kinderjahre verbrachte ich in Ingolstadt, Gauting und München, und nach Besuch von 4 Klassen Volksschule trat ich 1936 in die Gisela-Oberrealschule in München ein, wo ich im Februar 1944 als Luftwaffenhelfer das Abitur machte. Nach Entlassung aus Gefangenschaft belegte ich bei der Eröffnung der Ludwig-Maximilians-Universität München im Jahre 1945 zwei Semester lang Jura und Volkswirtschaft, um dann auf Tiermedizin umzusatteln. Im Dezember 1950 legte ich an der Gisela-Oberrealschule in München die Prüfung für das kleine Latinum ab. Am 19. 7. 1951 bestand ich mit dem Urteil "gut" vor dem Prüfungsausschuß in München die tierärztliche Prüfung und daraufhin wurde mir mit Wirkung vom 15. 2. 1952 für das Gebiet des Deutschen Reiches die Bestallung als Tierarzt erteilt, nachdem ich bei Herrn Dr. Kippe in Bad Berneck (Oberfranken) die vorgeschriebene Praktikantenzeit abgeleistet hatte. Anschließend war ich bis Februar 1953 bei Herrn Dr. Josef Spießl in Dingolfing (Niederbayern) als Assistent tätig und habe dann bis zum November 1954 bei ca. 30 fränkischen, ober- und niederbayerischen Kollegen Urlaubs- und Krankheitsvertretungen übernommen. Im Dezember 1954 habe ich mich in Schönberg im Bayerischen Wald niedergelassen und mir eine existenzfähige Praxis aufgebaut.



